

UNIVERSITE DE GENEVE
Département de physiologie
Département de biologie animale,
Anatomie et physiologie comparées

FACULTE DES SCIENCES
Professeur J. POSTERNAK
Professeur H.J. HUGGEL

EFFET DE L'HYPOXIE SUR LE POTENTIEL DE REPOS
ET LE POTENTIEL RECEPTEUR DES CELLULES RETINIENNES
DU FAUX-BOURDON (APIS MELLIFICA L.)

THESE

présentée à la Faculté des sciences de l'Université de Genève
pour obtenir le grade de docteur ès sciences,
mention biologique

par

Gérard **EPERON**

de

Genève

Texte condensé de la thèse No 1666, approuvée par la Faculté des sciences. Des copies en microfilms du texte complet peuvent être obtenues auprès de la Bibliothèque publique et universitaire de Genève. Le texte complet peut être consulté à cette bibliothèque ou à la Bibliothèque nationale suisse à Berne.

Thèse N° 1666

GENEVE
Editions Médecine et Hygiène
1974

**EFFET DE L'HYPOXIE SUR LE POTENTIEL DE REPOS
ET LE POTENTIEL RECEPTEUR DES CELLULES RETINIENNES
DU FAUX-BOURDON (APIS MELLIFICA L.)**

THESE

présentée à la Faculté des sciences de l'Université de Genève
pour obtenir le grade de docteur ès sciences,
mention biologique

par

Gérard EPERON

de

Genève

Texte condensé de la thèse No 1666, approuvée par la Faculté des sciences. Des copies en microfilms du texte complet peuvent être obtenues auprès de la Bibliothèque publique et universitaire de Genève. Le texte complet peut être consulté à cette bibliothèque ou à la Bibliothèque nationale suisse à Berne.

Thèse No 1666

GENEVE
Editions Médecine et Hygiène
1974

La Faculté des sciences, sur le préavis du professeur ordinaire F. Baumann (Faculté de médecine), directeur de thèse, du professeur ordinaire H. Huggel, responsable devant la Faculté des sciences et du professeur ordinaire J. Posternak (Faculté de médecine), autorise l'impression de la présente thèse, sans exprimer d'opinion sur les propositions qui y sont énoncées.

Genève, le 4 juillet 1974

Le doyen :
Jean Muller

Thèse No 1666



Je tiens à exprimer ma reconnaissance à certaines personnes sans lesquelles ce travail n'aurait pas pu être réalisé : le professeur J. Posternak qui m'a offert l'accueil de son département et le professeur H.J. Huggel qui a accepté très aimablement d'être le directeur de cette thèse pour la Faculté des sciences. J'aimerais surtout remercier le professeur F. Baumann qui a dirigé ce travail et dont le savoir et les conseils ont été déterminants dans son élaboration. De même mon ami J. Carreras pour de nombreuses discussions fructueuses et pour son aide devant certaines difficultés pratiques. J'aimerais encore remercier Messieurs M. Rüphi pour son appui technique, R. Mira pour les photographies et C. Ruckstuhl, Inspecteur cantonal des ruchers, qui a fourni généreusement les animaux utilisés dans ce travail.

A MES PARENTS

I N T R O D U C T I O N

L'enregistrement, à l'aide d'une microélectrode intracellulaire, de la réponse à une forte stimulation lumineuse d'une cellule rétinienne de faux-bourdon consiste en une dépolarisation lente - le potentiel récepteur, (composé d'un sommet et d'un plateau) - à laquelle se superpose un potentiel de pointe; enfin une légère hyperpolarisation suit la réponse.

Il est maintenant bien établi que cette réponse - comme celle des cellules rétiniennes de la plupart des invertébrés - est due à une augmentation de la perméabilité de la membrane aux ions qui se traduit par une chute de sa résistance électrique et une entrée passive de sodium dans la cellule (B. FULPIUS et F. BAUMANN, 1969; R. MILECCHIA et A. MAURO, 1969; H.M. BROWN et coll., 1970).

La persistance de la fonction réceptrice de ces cellules doit donc dépendre, entre autres, d'un processus actif de restauration des gradients ioniques. Ce travail, accompli par la "pompe à sodium", dépend d'une source d'énergie constituée par l'ATP, dont le renouvellement est associé au catabolisme énergétique qui, dans la rétine d'insecte, est essentiellement aerobie (H. LANGER, 1962).

Le but de ce travail est d'examiner les effets de l'hypoxie sur la réponse à la lumière des cellules rétiniennes et de déterminer les causes de ces effets, afin d'étudier les liens entre l'activité électrique et le métabolisme.

M A T E R I E L E T M E T H O D E

La préparation est constituée par une demi-tête de faux-bourdon (*Apis mellifica* L.) baignant dans une solution physiologique de Ringer saturée en oxygène ou pauvre en ce gaz. Il est possible d'illuminer la préparation de façon continue ou périodique à différents niveaux d'intensité. Les enregistrements sont faits à l'aide d'une micropipette de verre remplie de KCl et au moyen de l'équipement habituellement utilisé pour ce genre d'expériences.

R E S U L T A T S

Il a été observé qu'en hypoxie, les cellules rétiniennes dépolarisent et deviennent rapidement insensibles à la lumière. Ces effets sont réversibles, car une fois la rétine réoxygénée, le potentiel de membrane retourne à sa valeur normale et la réponse à la lumière réapparaît dans sa forme et son amplitude originelles, (fig. 1 et 2).

Nous avons étudié en détail les caractéristiques de la réponse à la lumière en condition hypoxique ainsi que l'évolution du potentiel de membrane et des différentes composantes de la réponse au cours d'une période d'hypoxie de quelques minutes suivie d'un retour à la solution oxygénée, (fig. 3). Un potentiel de pointe produit par un bref courant dépolarisant (appliqué par l'électrode) ou à la cessation d'un courant hyperpolarisant, disparaît en hypoxie et réapparaît après retour en milieu oxygéné de la même manière que le potentiel de pointe produit par la phase initiale du potentiel récepteur. A nouveau pourvue d'oxygène en suffisance, la cellule repolarise rapi-

dement et ce phénomène se prolonge même en une hyperpolarisation transitoire. La réapparition des réponses à la lumière suit la repolarisation. Quant à l'hyperpolarisation qui ordinairement suit une réponse, elle disparaît en hypoxie.

L'effet d'une stimulation lumineuse unique ou périodique sur le potentiel de membrane et les réponses est étudié en enregistrant d'une façon continue une cellule au cours d'expériences où se succèdent plusieurs périodes d'hypoxie à l'intérieur desquelles les paramètres de la stimulation sont modifiés. Il est apparu que l'évolution du potentiel de membrane et de la réponse dépend étroitement de la stimulation : la disparition des réponses et la dépolarisation sont d'autant plus rapides que l'illumination est intense ou se prolonge, (fig. 4). A l'obscurité, le potentiel de repos reste même inchangé au cours des périodes d'hypoxie relativement brèves, (fig. 5).

DISCUSSION

L'hypothèse d'une augmentation générale de la perméabilité membranaire aux ions due à l'hypoxie et celle d'une action sur les photopigments, sont discutées et considérées comme peu adéquates pour expliquer nos résultats expérimentaux. L'explication la mieux compatible avec l'ensemble de ces résultats repose sur l'inactivation d'une pompe tributaire de l'oxygène. Il est probable qu'en hypoxie, le potassium s'échappe de la cellule et s'accumule dans le mince espace péricellulaire. La diminution du gradient potassique est la cause directe de la dépolarisation. Le sodium pénètre dans la cellule et la diminution consécutive du gradient sodique rend compte logiquement de la disparition des réponses en hypoxie. Mise à nouveau en présence d'oxygène en quantité suffisante, la pompe, stimulée par le sodium intracellulaire, rétablit les gradients potassique et sodique ainsi que le potentiel

de repos. Une composante électrogène de cette pompe explique la rapidité de la repolarisation et l'hyperpolarisation momentanée qui la suit.

Bien qu'il ne soit pas possible d'exclure la participation d'autres phénomènes, l'explication de l'altération des gradients ioniques par l'inactivation d'une pompe trouve une confirmation dans la forme des réponses à la lumière en hypoxie : au début de la privation en oxygène ces réponses sont semblables à celles que fournit une préparation baignée dans un milieu hyperpotassique, et en période de récupération, après repolarisation, elles présentent des caractéristiques communes avec celles produites en milieu hyposodique (B. FULPIUS et F. BAUMANN, 1969). Cette explication est encore soutenue par les expériences montrant que l'effet de l'hypoxie est presque entièrement dépendant de la stimulation. La lumière provoque une entrée de sodium et une sortie de potassium (J.J.H.H.M. DE PONT, G. DUNCAN et S.L. BONTING, 1971; Ch.E. HOLT et J.E. BROWN, 1972); en absence d'un apport suffisant en oxygène, la pompe est alors incapable de restaurer les gradients ainsi altérés et la cellule dépolarise d'autant plus vite que la stimulation est forte.

La cellule rétinienne, qui fonctionne comme un transformateur-amplificateur dépendant de l'énergie métabolique, ne parvient plus, en l'absence d'une oxygénation suffisante, à maintenir son "homéostasie ionique", réglée normalement par la concentration du sodium intracellulaire. Le présent travail montre donc que les cellules rétiniennes du faux-bourdon ont très peu de réserves ioniques mais compensent cela par une pompe très active, dépendant étroitement du métabolisme énergétique aérobie.

Des études biochimiques avaient d'ailleurs démontré chez les insectes un lien très étroit entre la consommation d'oxygène associée à l'activité métabolique et l'efficacité de la stimulation (K. HAMDORF et

H. LANGER, 1966). En électrophysiologie, Ch. HOFFMANN (1960), avait déjà observé chez un insecte la disparition de la réponse ERG en absence d'oxygène, dans des conditions expérimentales différentes des nôtres. Mais c'est la première fois à notre connaissance, que sont étudiées les conséquences électrophysiologiques de la privation en oxygène directement par enregistrements intracellulaires sur une cellule rétinienne d'insecte, et même sur un photorécepteur en général.

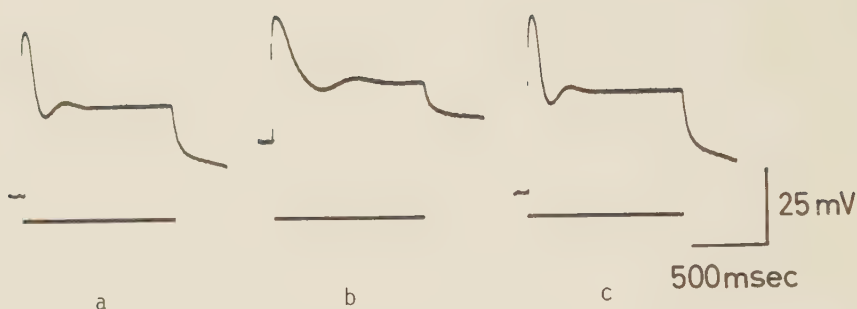


Figure 1. Effet de l'hypoxie sur l'amplitude et la forme de la réponse.

La préparation est stimulée par des éclairs de 1 sec. et de forte intensité toutes les 10 sec. L'enregistrement a) est obtenu en milieu oxygéné; la réponse b) est produite par la même cellule après 5 min. de privation en oxygène : noter l'élévation de la ligne de base qui témoigne de la dépolarisation, la diminution de l'amplitude de la réponse et l'altération de sa forme. A nouveau baignée dans le milieu normal, la cellule, après quelques minutes (enregistrement c) produit une réponse normale.

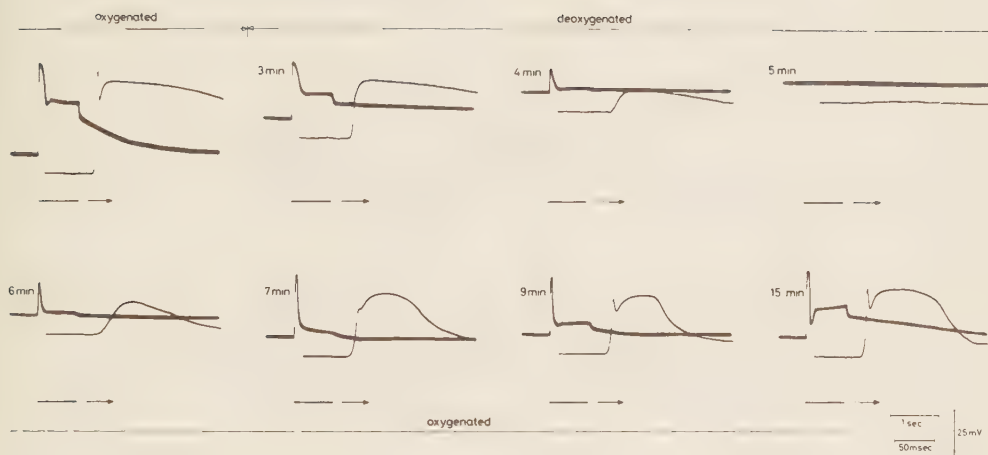


Figure 2. Modifications d'une réponse à la lumière au cours d'une période d'hypoxie et d'une période de récupération en milieu oxygéné. La préparation, qui est stimulée par des éclairs de 1 sec. et d'intensité - 1.2 toutes les 10 sec., subit une période de 5 min. de privation en oxygène. Un balayage 25 fois plus rapide montre le détail du début des réponses.

A la fin de la période d'hypoxie, la cellule rétinienne, complètement dépolarisée, ne répond plus à la lumière. En période de récupération, le sommet du potentiel récepteur regagne son amplitude rapidement alors que le potentiel de pointe tarde à réapparaître et que le plateau reprend encore plus lentement son apparence normale.

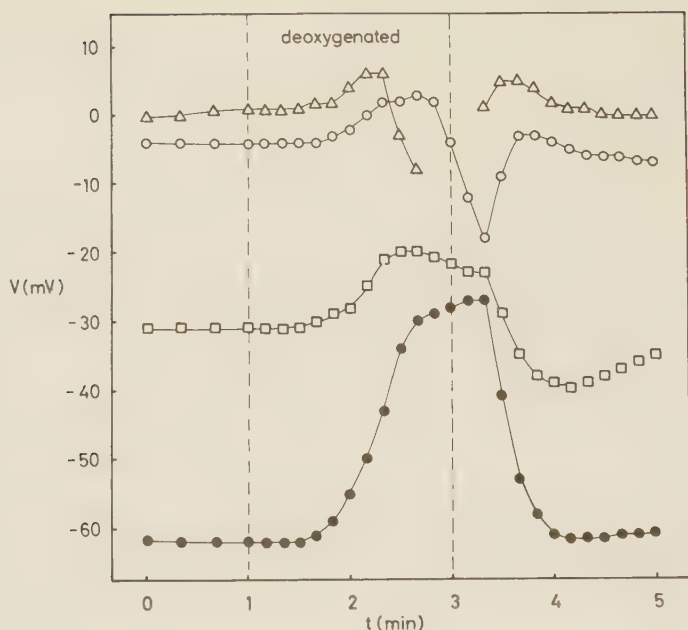


Figure 3. Evolution du potentiel de membrane au repos et à différents moments de la réponse à la lumière au cours d'une expérience de privation en oxygène.

La préparation est stimulée par un éclair de 1 sec., d'intensité - 3.0 toutes les 10 sec. La période de privation en oxygène dure 2 min.

Les cercles pleins correspondent au potentiel de repos, les carrés, les cercles vides et les triangles, respectivement aux potentiels mesurés pendant le plateau, au sommet et pendant le potentiel de pointe.

Après la période d'hypoxie tous les paramètres mesurés tendent à se rejoindre vers - 20 mV : la cellule à ce moment ne répond donc presque plus à la lumière. Après retour aux conditions originales, avec une latence de 20 ou 30 sec., la cellule repolarise et la réponse regagne son amplitude en moins d'une min. (à l'exception du plateau dont la récupération est plus lente).

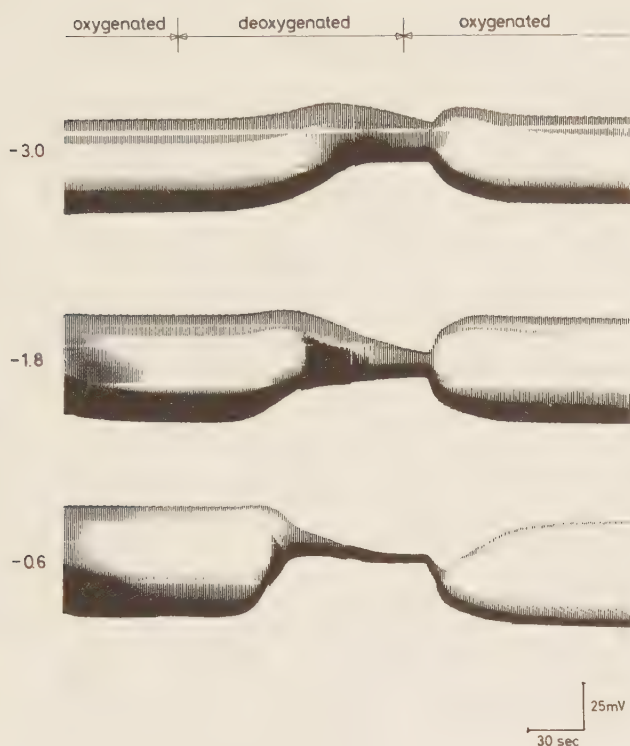


Figure 4. Influence de l'intensité de la stimulation lumineuse sur l'effet de l'hypoxie.

La rétine est stimulée par des éclairs de 10 msec. espacés de 1 sec. L'enregistrement, sur une base-temps très lente, contracte chaque réponse en un seul trait vertical. La rétine subit trois périodes de privation en oxygène de 2 min. chacune, espacées par des périodes de récupération en milieu oxygéné. L'intensité de la stimulation, notée à gauche de la figure est différente au cours de chacune des trois périodes d'hypoxie ainsi que dans les minutes qui les précèdent et les suivent immédiatement.

On constate que la vitesse de dépolarisation en hypoxie croît avec l'intensité de la stimulation, que la réponse disparaît plus rapidement et qu'elle revient plus lentement à son amplitude normale; en revanche la repolarisation n'est pratiquement pas affectée par l'intensité lumineuse.



Figure 5. Effet d'un éclair unique appliqué au cours d'une période d'hypoxie.

- a) La rétine a subi une période de 4 min. de privation en oxygène au milieu de laquelle elle est stimulée par un éclair unique (flèche). On note que la repolarisation de la cellule rétinienne n'est que partielle et qu'elle est suivie d'une dépolarisation progressive. Le retour en milieu oxygéné entraîne une repolarisation rapide avec une hyperpolarisation transitoire du potentiel de membrane de la cellule rétinienne.
- b) La même cellule rétinienne quelques minutes après, subit à nouveau une période de 4 min. sans oxygène, mais en absence de toute stimulation cette fois. Le potentiel de repos se maintient constant pendant près de 4 min. puis un mouvement de dépolarisation s'amorce qui est réversible après retour en milieu oxygéné, tout comme en a).

L'hypoxie seule entraîne donc à la longue une dépolarisation de la cellule rétinienne mais une seule stimulation suffit à précipiter ce phénomène.

